

PATENT COOPERATION TREATY

EO/US
PCT/EP98/05899

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: <p style="text-align: center;">25 March 1999 (25.03.99)</p>	
International application No.: <p style="text-align: center;">PCT/EP98/05899</p>	Applicant's or agent's file reference: <p style="text-align: center;">981448wo Me/gn</p>
International filing date: <p style="text-align: center;">16 September 1998 (16.09.98)</p>	Priority date: <p style="text-align: center;">16 September 1997 (16.09.97)</p>
Applicant: <p style="text-align: center;">FORSSMANN, Wolf-Georg et al</p>	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

04 December 1998 (04.12.98)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p style="text-align: center;">The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	Authorized officer: <p style="text-align: center;">J. Zahra</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
---	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

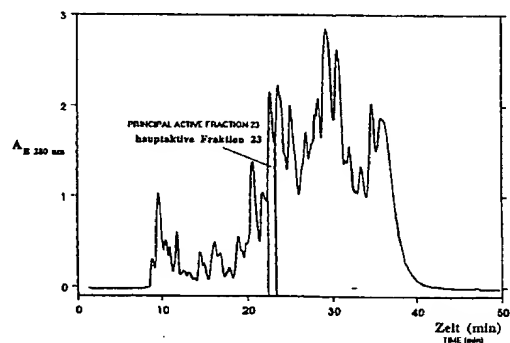
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 7/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/14231 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 25. März 1999 (25.03.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/05899 (22) Internationales Anmeldedatum: 16. September 1998 (16.09.98) (30) Prioritätsdaten: 197 40 604.1 16. September 1997 (16.09.97) DE 198 05 385.1 11. Februar 1998 (11.02.98) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ZUCHT, Hans-Dieter [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). LIEPKE, Cornelia [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). (74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>

(54) Title: **BIFIDUS STIMULATING PEPTIDES**(54) Bezeichnung: **BIFIDOGENE PEPTIDE**

(57) Abstract

The invention relates to peptides which are obtainable by mixing cow milk or human milk with proteases followed by a two hour incubation; centrifugation in order to remove milk fat; acidification to a pH of 2.0 by strong acidulation; separating the precipitated proteins; applying at least one reverse phase high pressure liquid chromatography (HPLC) step; applying a cationic exchanger HPLC step; collecting fractions; adjusting the fractions to a salt content < 25 mM for executing an activity test by means of dialysis or reverse phase HPLC; cultivating bifidobacterium and e coli in the presence of the fractions and selection of fractions which satisfy condition BW/B0 - EW/E0 ≥ 0,15, wherein BW denotes the bacterial count which is obtained during a 16-hour incubation of bifidobacterium in 50 % elliker broth in the presence of peptides in a concentration of 200 µg/ml, B0 denotes the bacterial count which is obtained during the agent-free control incubation, EW denotes the bacterial count which is obtained during 16 hour incubation of e coli in 3 g/l tryptic soy broth in the presence of the peptides in a concentration of 200 µg/ml, E0 denotes the bacterial count which is obtained during the agent-free control incubation; and isolating the available peptide in said fraction. In addition, the amidated, acetylated, sulphatized, phosphorylated, glycosylized, oxidized derivatives or fragments with bifidus stimulating characteristics and peptides are obtainable by combining the peptides, fragments or derivatives by means of chemical bonding.



(57) Zusammenfassung

Peptide erhältlich durch Versetzen von Kuhmilch oder Humanmilch mit Proteasen und anschließender Inkubation für zwei Stunden, Zentrifugation, um Milchfett zu entfernen, Ansäuern auf einen pH von 2,0 durch starke Säuren, Abtrennung der ausgefallenen Proteine, Anwendung mindestens eines Reverse-Phase-HPLC-Schrittes, Anwendung eines Kationenaustauscher-HPLC-Schrittes, Sammeln von Fraktionen, Einstellen der Fraktion auf einen Salzgehalt < 25 mM für die Durchführung von Aktivitätstests durch Dialyse oder Reverse-Phase-HPLC, Kultivierung von Bifidobakterium Bifidum und E. coli in Gegenwart der Fraktionen und Auswahl von Fraktionen, die der Bedingung: $BW/B_0 - EW/E_0 \geq 0,15$ (bifidogen) genügen, worin BW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von Bifidobakterium Bifidum in 50 % Elliker Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/ml erhalten wird, B₀ die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird, EW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von E. coli in 3 g/l Tryptic Soy Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/l erhalten wird, E₀ die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird, Isolierung des in dieser Fraktion vorhandenen Peptids sowie die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylierten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Fragmente mit bifidogenen Eigenschaften und Peptide, die durch Kombination der Peptide, Fragmente oder Derivate mittels chemischer Verknüpfung erhältlich sind.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Bifidogene Peptide

Die vorliegende Erfindung betrifft bifidogene Peptide, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie die Verwendung der bifidogenen Peptide.

Von Milch ist bekannt, daß sie fördernd auf den Gesundheitszustand von Säuglingen wirkt. Dies wird vielfach auf den Einfluß der Milch auf die Ausbildung einer säuglingstypischen Darmflora zurückgeführt, die zu mehr als 90% aus *Bifidobacterium bifidum* besteht.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es Peptide bereitzustellen, die einen positiven Einfluß auf die Darmflora haben.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird gelöst durch Peptide mit den Merkmalen des Patentanspruchs 1. Bei den erfindungsgemäßen Peptiden handelt es sich um Peptide, die erhältlich sind durch

- Versetzen von Kuhmilch oder Humanmilch mit Proteasen und anschließender Inkubation für zwei Stunden,
- Zentrifugation, um Milchfett zu entfernen,
- Ansäuern auf einen pH von 2,0 durch starke Säuren,
- Abtrennung der ausgefallenen Proteine,
- Anwendung mindestens eines Reverse-Phase-HPLC-Schrittes,
- Anwendung eines Kationenaustauscher-HPLC-Schrittes,
- Sammeln von Fraktionen,

- 2 -

- Einstellen der Fraktion auf einen Salzgehalt < 25 mM für die Durchführung von Aktivitätstests durch Dialyse oder Reverse-Phase-HPLC,
- Kultivierung von Bifidobakterium Bifidum und E. coli in Gegenwart der Fraktionen und Auswahl von Fraktionen, die der Bedingung

$$\frac{BW}{B0} - \frac{EW}{E0} \geq 0,15 \text{ (bifidogen)}$$

genügen, worin BW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von Bifidobakterium bifidum in 50% Elliker Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/ml erhalten wird,

B0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird,

EW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von E. coli in 3 g/l Tryptic Soy Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/l erhalten wird, E0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird,

- Isolierung des in dieser Fraktion vorhandenen Peptids
- sowie die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylierten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Fragmente mit bifidogenen Eigenschaften.

Die erfindungsgemäßen Peptide wirken antimikrobiell gegen Bakterien, die in der natürlichen Säuglingsdarmflora nicht oder nur in geringen Mengen vorkommen und fördern das Wachstum von erwünschten Bakterien wie Bifidobakterien, indem sie die Bifidobakterien im Wachstum stärker als andere Bakterien fördern oder nur die nichterwünschten Bakterien selektiv hemmen. Diese Eigenschaft, Bifidobakterien einen Wachstumsvorteil zu verschaffen, wird als bifidogen bezeichnet.

- 3 -

Bevorzugt werden Peptide eingesetzt, die folgende Aminosäuresequenz aufweisen:

R_1 -EQLLRLKK- R_2 , R_1 -YLEQLLRLKKY- R_2 , R_1 -NRQRNILR- R_2 ,
 R_1 -YMNGMNRQRNILR- R_2 , R_1 -FQWQRNMRK- R_2 , R_1 -HTGLRRTA- R_2 ,
 R_1 -FTAIQNLRK- R_2 , R_1 -EVAARARVW- R_2 , R_1 -WQRNMRKV- R_2 ,
 R_1 -LARTLKRLK- R_2 , R_1 -YKQKVEKV- R_2 , R_1 -LVRYTKKV- R_2 ,
 R_1 -KYLIEIARR- R_2 , R_1 -ARRARVVWCAVG- R_2 , R_1 -ARRARVVWCAVGE- R_2 ,
 R_3 -CIAL- R_4 R_3 -CIAL- R_4

R_1 -YQRRPAIAINNPYVPRITYYANPAVVRPHAQIPQRQYLPNSHPPTVVRPNLHPSF- R_2 ,
 R_1 -GRRRRSVQWC^TVSQPEATKCFQWQRNMR^RVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA- R_2 ,
 R_1 -GRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKV^RRGPPVSCIKRDSPIQCIQA- R_2 ,
 R_1 -GRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKV^RRGPPVSCIKRDSPIQCIQA- R_2 ,
 R_1 -VYQHQA^KAMPKPW^IQPKTKVIPYVRYL- R_2 , R_1 -ARRARVVWAAVG- R_2 ,
 R_1 -CAVGGGCIAL- R_2 ,
 R_1 -RHTRKYWC^RQGARGGCITL- R_2 .

worin

R_1 , R_3 unabhängig voneinander NH_2 , eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis 100 Aminosäuren darstellen und
 R_2 , R_4 unabhängig voneinander $COOH$, $CONH_2$, eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis zu 100 Aminosäuren darstellen und die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylierten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Fragmente mit bifidogenen Eigenschaften.

Bevorzugt weisen R_1 , R_2 , R_3 , R_4 eine Länge von bis zu 50, mehr bevorzugt von bis zu 20 und am meisten bevorzugt eine Länge von bis zu 10 Aminosäuren auf.

Die erfindungsgemäßen Peptide können durch Aufreinigung aus Kuhmilch oder Humanmilch erhalten werden. Alternativ ist jedoch auch die Expression in gentechnisch veränderten Organismen oder die Herstellung durch chemische Peptidsynthese möglich.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung sind die Nukleinsäuren, die für die bifidogenen Bakterien kodieren, sowie Antikörper, die gegen bifidogene Peptide gerichtet sind.

Die erfindungsgemäßen Peptide und/oder Nucleinsäuren können zusammen mit pharmazeutisch üblichen Hilfsstoffen in Arzneimitteln enthalten sein. Dazu werden bevorzugt galenische Zubereitungen eingesetzt und Applikationsformen gewählt, bei denen die Peptide undegradiert an den Wirkort gelangen.

Vorzugsweise wurden die erfindungsgemäßen Peptide in Mengen von 0,1 bis 100 mg/kg Körpergewicht eingesetzt. Wirksame Nucleinsäuremengen sind beispielsweise 0,01 mg bis 100 mg/kg Körpergewicht. Bevorzugt liegt die Menge im Bereich von 1 bis 10 mg/kg Körpergewicht für die Peptide und Nucleinsäuren.

Die erfindungsgemäßen Peptide können auch zusammen mit Nährstoffen in Nahrungsmittel enthalten sein.

Darüber hinaus können die erfindungsgemäßen Peptide und/oder die gegen die Peptide gerichteten Antikörper zusammen mit weiteren Hilfsstoffen auch in Diagnostikmittel enthalten sein.

Die erfindungsgemäßen Peptide und Nukleinsäuren eignen sich zur Behandlung von durch mikrobielle Fehlbesiedlungen bedingte Erkrankungen wie Infektionen, Entzündungen, mikrobiell induzierten Tumoren, mikrobiell bedingten degenerativen Erkrankungen, Durchfallerkrankungen, Koliken, Abweichung der Mund-, Darm- und Vaginalflora, Karies. Die mikrobielle Fehlbesiedlung kann beispielsweise durch Bakterien, Pilze, Hefen, Protisten, Viren, Mycoplasmen, Filarien und/oder Plasmodien bedingt sein.

Die erfindungsgemäßen Peptide eignen sich auch als Hilfsstoff in der Nahrungsmittelzubereitung im Sinne von Fermentationshilfen.

Es wird insbesondere bevorzugt, daß zwei oder mehr Peptide gemeinsam eingesetzt werden oder Peptide eingesetzt werden, die zwei oder mehr der erfindungsgemäßen Peptidsequenzen aufweisen. Das unterschiedliche Wirkungsspektrum der Einzelstoffe bzw. Stoffe, die Einzelsequenzen oder erfindungsgemäße Peptide aufweisen, erlaubt es, beim Vorliegen von Resistenzen von Mikroorganismen durch eine geeignete Kombination von Sequenzen oder durch eine Kombination der Einzelsubstanzen eine optimale Hemmung der unerwünschten Mikroorganismen zu erzielen.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung weiter erläutern:

Beispiel 1

Behandlung von Milch

Humane Milch wurde mit Pepsin (20 mg/g Protein) versetzt, nachdem sie mit HCl auf einen pH von 3,5 eingestellt wurde. Die enzymatische Reaktion wurde für zwei Stunden bei 37°C inkubiert und durch Kochen für fünf Minuten gestoppt. Anschließend wurde zentrifugiert (20 min, 60.000 g bei 4°C) und das MilCHFett abgeschöpft. Die verbliebene Lösung wurde mit 0,1 % TFA versetzt und erneut zentrifugiert, um ausgefallene hochmolekulare Proteine abzutrennen.

HPLC Reinigung eines bifidogenen Peptides aus Milch

Für die Reinigung von bifidogenen Peptiden aus Milch müssen verschiedene HPLC Trennverfahren miteinander kombiniert werden, um eine möglichst reine Darstellung über eine optimale Trennleistung zu erzielen und inaktive, unerwünschte Bestandteile abzutrennen. Die jeweiligen Proben, die nach jedem Trennungsschritt entstehen, müssen in zwei Testsystemen getestet werden, d.h. ein Wachstumstest mit Bifidobakterien in Kombination mit einem Wachstumstest mit E. coli als Target (siehe Beispiele 3 und 4). Notwendig für die Reinigung ist die Kombination von mindestens einem Reverse-Phase Chromatographieschritt (bevorzugt

- 6 -

von zwei Reverse-Phase Chromatographischritten) und der Einsatz einer Kationenaustausch-HPLC-Trennung. In den Biotest muß die jeweilige Probe salzarm eingesetzt werden, um ein möglichst optimales Screeningergebnis zu erhalten.

Der erste Trennschritt wurde mit Hilfe einer Parcosil-C18 Säule (1 x 12,5 cm, 100 Å, Biotek, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

Puffer A: 0,1% TFA

Puffer B: Acetonitril mit 0,1% TFA

Gradient: 0 bis 60% B in 45 Minuten

Fluß: 2 ml / min

Detektion 280 nm (siehe Figur 1)

Rechromatografie von Fraktion 23 mit der gleichen Säule und einem flacheren Gradient (siehe Bild):

Puffer A: 0,1% TFA

Puffer B : Acetonitril mit 0,1% TFA

Gradient: 0 bis 20% B in 5 Minuten

20 bis 50% B in 45 Minuten

Detektion: 214 nm (siehe Figur 2)

Rechromatografie von Fraktion 16 aus dem vorangegangenen Trennschritt mit der gleichen Säule, aber anderem Elutionsmittel, um die Selektivität bei der Trennung zu verändern.

Puffer A: 0,1% TFA

Puffer B: 0,1% TFA in Methanol

Gradient: 0 bis 40% B in 5 Minuten

40 bis 70% B in 45 Minuten

Detektion: 214 nm (siehe Figur 3)

- 7 -

Rechromatografie der aktiven Fraktion 21 mit einer Kationenaustausch-HPLC:

Säule: Parcosil Pepkat, 4 x 50 mm, 300 Å, 5 µm, Biotek, Heidelberg

Puffer A: 10 mM Phosphatpuffer pH 4,5

Puffer B: Puffer A mit 1 M NaCl

Fluß: 0,75 ml/min

Gradient: 0 bis 15% B in 5 Minuten

15 bis 50% B in 35 Minuten

Detektion: 214 nm (siehe Figur 4)

Die erhaltenen Fraktionen wurden jede einzeln in einem kurzen Reverse Phase HPLC Lauf entsalzt, bevor sie zum Test auf antimikrobielle und bifidogene Aktivität zugeführt wurde.

Durch Massenspektrometrie und Aminosäuresequenzierung wurden die folgenden Peptide identifiziert:

Fraktion 9 enthielt die reine, bifidogene Komponente

YQRRPAIAINNPYVPRTYYANPAVVRPHAQIPQRQYLPNSHPPTVVRPNLHPSF

(caseinK-63-117)

Fraktion 10 enthält die bifidogene Komponente

GRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDSPICCIQ

(neutrophil-lactoferrin-20-67)

und Fraktion 11 enthält die bifidogene Komponente mit einer Adduktmasse von +16 was darauf hindeutet, daß es sich um ein Oxidationsprodukt handelt (vermutlich ist ein Methionin oxidiert).

Beide Peptide und das Oxidationsprodukt haben eine bifidogene Aktivität.

Beispiel 2

Nachweis der wachstumsregulierenden Aktivität auf E. coli

Fraktionen aus der HPLC wurden mit *E. coli* K12 eingesetzt. Der Test wird in 3 g/l Tryptic Soy broth (Sigma) folgendermaßen durchgeführt:

Für jeden Assay wurden Kulturen von *E. coli* K12 frisch in Tryptic Soy broth (Firma Sigma, Deisenhofen, Deutschland, Bestellnummer T8907) angeimpft (Difco Manual, 10th Ed., S. 1027). Die Inkubation dieser Bakterien erfolgte immer unter aeroben Bedingungen bei 37°C für 16 Stunden. Zu testende Peptide wurden zu einer Testlösung, bestehend aus 200 µl 3 g/l Tryptic Soy broth, in 96-Loch Zellkulturplatten gegeben und mit einem Inokulum von 20 µl einer verdünnten Bakteriensuspension angeimpft. Die photometrische Absorption des Inokulums betrug 0,05, gemessen bei 500 nm. Das Wachstum der Bakterien unter dem Einfluß der Peptide wurde nach 16 Stunden ebenfalls photometrisch im ELISA-Reader bestimmt und manuell mikroskopisch bestimmt.

Beispiel 3

Nachweis der wachstumsregulierenden Aktivität auf Bifidobacterium bifidum

Für jeden Assay wurden Kulturen von *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 frisch in Elliker broth (Difco, Detroit, USA) (Tryptone 20 g, Yeast Extract (Hefeextrakt) 5 g, Gelatin (Gelatine) 2,5 g, Dextrose 5 g, Lactose (Laktose) 5 g, Saccharose 5 g, Sodium Chloride (NaCl) 4 g, Sodium-Acetate (Natriumacetat) 1,5 g, Ascorbic Acid (Ascorbinsäure) 0,5 g) angeimpft. Die Inkubation dieser Bakterien erfolgte immer unter anaeroben Bedingung bei 37°C für 16 bis 18 Stunden. Zu testende Peptide wurden zu einer

- 9 -

Testlösung bestehend aus 200 μ l 50% Elliker broth in 96-Loch Zellkulturplatten gegeben und mit einem Inokulum von 20 μ l einer verdünnten Bakteriensuspension angeimpft. Die photometrische Absorption des Inokulums betrug 0,05 gemessen bei 550 nm. Das Wachstum der Bakterien unter dem Einfluß der Peptide wurde nach 16 Stunden ebenfalls photometrisch im ELISAREader bestimmt und manuell mikroskopisch bestimmt. Als Positivkontrolle diente N-acetylglucosamin. Für diesen Test können nur Bifidus-Kulturen eingesetzt werden, die auf N-Acetylglucosamin reagieren. Nach einigen Passagen verlieren Bifidobakterien diese Eigenschaft, diese können dann für diesen Wachstumstest nicht mehr eingesetzt werden.

Beispiel 4

Als bifidogen wurden die Fraktionen identifiziert, bei denen der Wert

BW		EW		
--	-	--	\geq	0,15 (bifidogen)
B0		E0		

ist.

Patentansprüche

1. Peptide erhältlich durch

- Versetzen von Kuhmilch oder Humanmilch mit Proteasen und anschließender Inkubation für zwei Stunden,
- Zentrifugation, um Milchfett zu entfernen,
- Ansäuern auf einen pH von 2,0 durch starke Säuren,
- Abtrennung der ausgefallenen Proteine,
- Anwendung mindestens eines Reverse-Phase-HPLC-Schrittes,
- Anwendung eines Kationenaustauscher-HPLC-Schrittes,
- Sammeln von Fraktionen,
- Einstellen der Fraktion auf einen Salzgehalt < 25 mM für die Durchführung von Aktivitätstests durch Dialyse oder Reverse-Phase-HPLC,
- Kultivierung von Bifidobakterium Bifidum und E. coli in Gegenwart der Fraktionen und Auswahl von Fraktionen, die der Bedingung

BW		EW	
--	-	--	≥ 0,15 (bifidogen)
B0		E0	

genügen, worin BW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von Bifidobakterium Bifidum in 50% Elliker Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/ml erhalten wird, B0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird.

EW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von E. coli in 3 g/l Tryptic Soy Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/l erhalten wird,

- 11 -

E0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstoff-freien Kontrollinkubation erhalten wird,

- Isolierung des in dieser Fraktion vorhandenen Peptids

sowie die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phospho-rylierten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Frag-mente mit bifidogenen Eigenschaften und Peptide, die durch Kombination der Peptide, Fragmente oder Derivate mittels chemischer Verknüpfung erhältlich sind.

2. Peptide gemäß Anspruch 1 mit der Aminosäuresequenz

R₁-EQLLRLKK-R₂, R₁-YLEQLLRLKKY-R₂, R₁-NRQRNILR-R₂,
 R₁-YMNGMNRQRNILR-R₂, R₁-FQWQRNMRK-R₂, R₁-HTGLRRTA-R₂,
 R₁-FTAIQNLRK-R₂, R₁-EVAARARVW-R₂, R₁-WQRNMRKV-R₂,
 R₁-LARTLKRLK-R₂, R₁-YKQKVEKV-R₂, R₁-LVRYTKKV-R₂,
 R₁-KYLYEIARR-R₂, R₁-ARRARVVWCAVG-R₂, R₁-ARRARVVWCAVGE-R₂,
 R₃-CIAL-R₄ R₃-CIAL-R₄

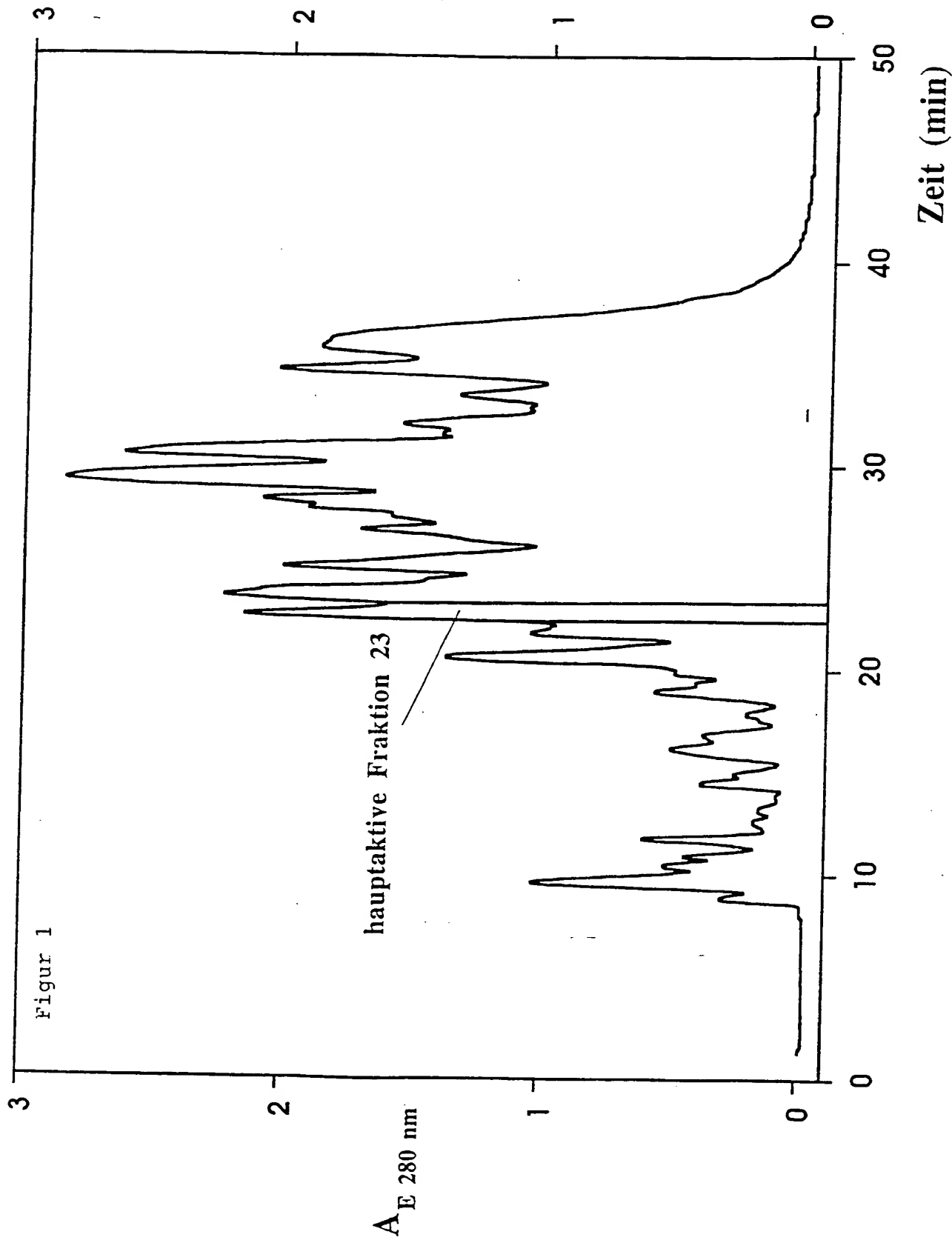
R₁-YQRRPAIAINNPYVPRTYYANPAVVRPHAQIPQRQYLPNSHPPTVVRRPNLHPSF-R₂,
 R₁-GRRRRSVQWCTVSQPEATKCFQWQRNMRRVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA-R₂,
 R₁-GRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA-R₂,
 R₁-GRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA-R₂,
 R₁-VYQHQAAMPKPWIQPKTKVIPYVRYL-R₂, R₁-ARRARVVWAAVG-R₂,
 R₁-CAVGGGCIAL-R₂,
 R₁-RHTRKYWCRQGARGGCITL-R₂.

worin

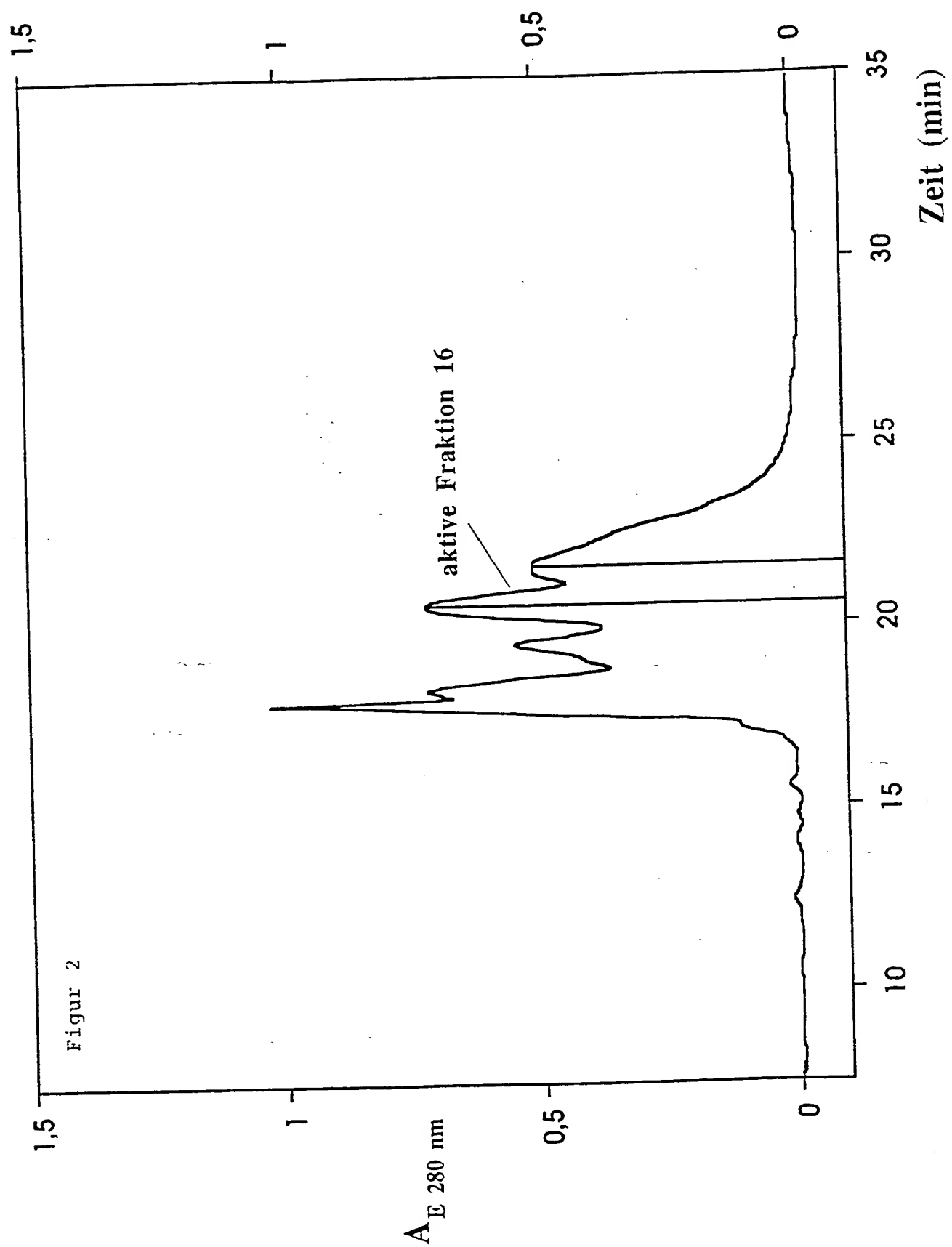
R₁, R₃ unabhängig voneinander NH₂, eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis 100 Aminosäuren darstellen und

R₂, R₄ unabhängig voneinander COOH, CONH₂, eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis zu 100 Aminosäuren darstellen und die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylier-ten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Fragmente mit bifidogenen Eigenschaften.

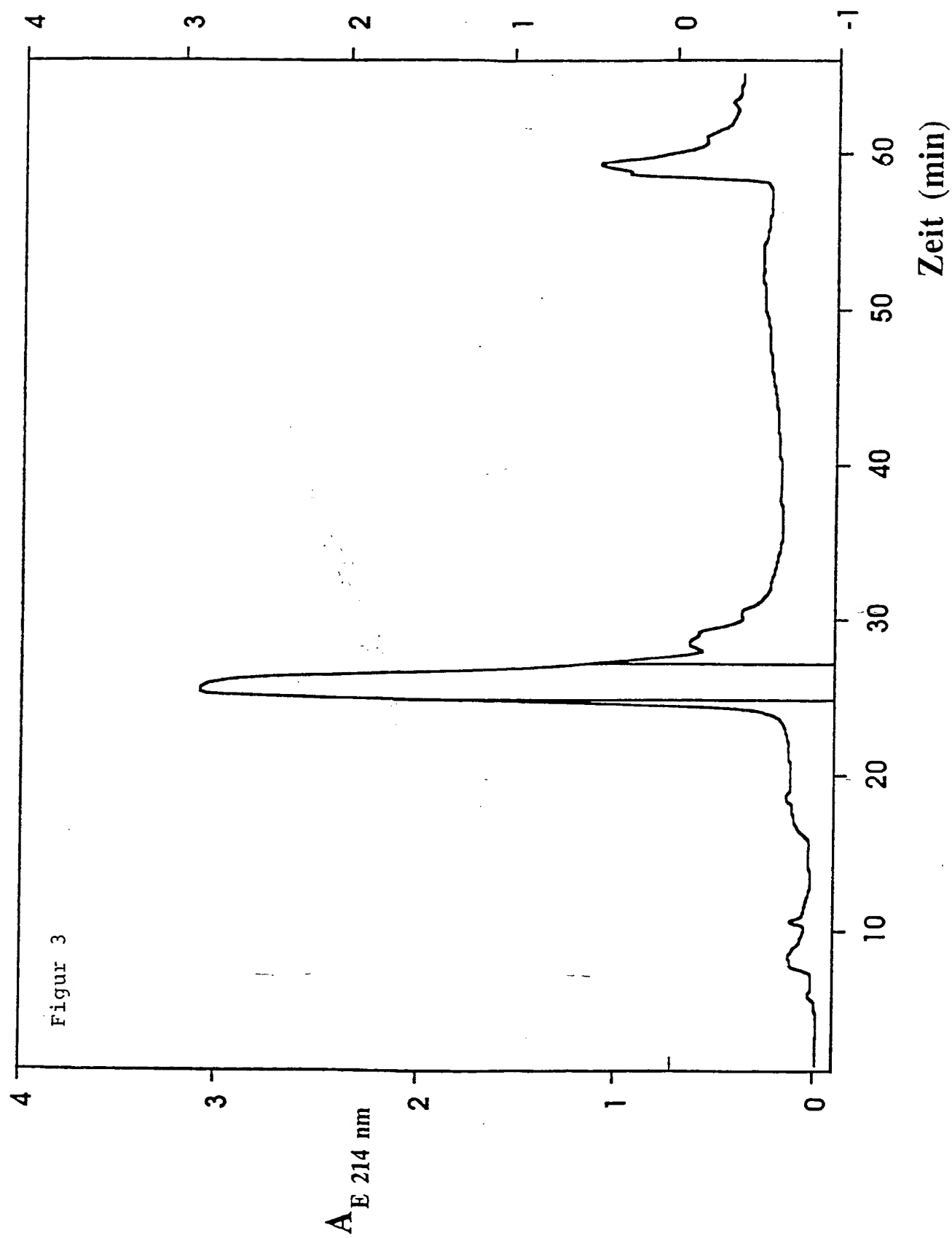
3. Verfahren zur Herstellung der Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 durch Aufreinigung aus Kuhmilch oder Humanmilch, Expression in gentechnisch veränderten Organismen oder chemische Synthese.
4. Nukleinsäuren kodierend für Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2.
5. Antikörper gerichtet gegen Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2.
6. Arzneimittel enthaltend mindestens eines der Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 und/oder mindestens eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 zusammen mit pharmazeutisch üblichen Hilfsstoffen.
7. Nahrungsmittel enthaltend Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 zusammen mit Nährstoffen.
8. Diagnostikmittel enthaltend Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 und/oder Antikörper gemäß Anspruch 5 zusammen mit weiteren Hilfsstoffen.
9. Verwendung der Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 und/oder der Nukleinsäuren gemäß Anspruch 3 zur Behandlung von durch mikrobielle Fehlbesiedlungen bedingten Erkrankungen beispielsweise durch Bakterien, Pilze, Hefen, Protisten, Viren, Mycoplasmen, Filarien, Plasmodien, wie Infektionen Entzündungen, mikrobiell induzierten Tumoren, mikrobiell bedingten degenerativen Erkrankungen, Durchfallerkrankungen, Koliken, Abweichung der Mund-, Darm- und Vaginalflora, Karies.
10. Verwendung der Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 zur Herstellung eines Nahrungsmittels.



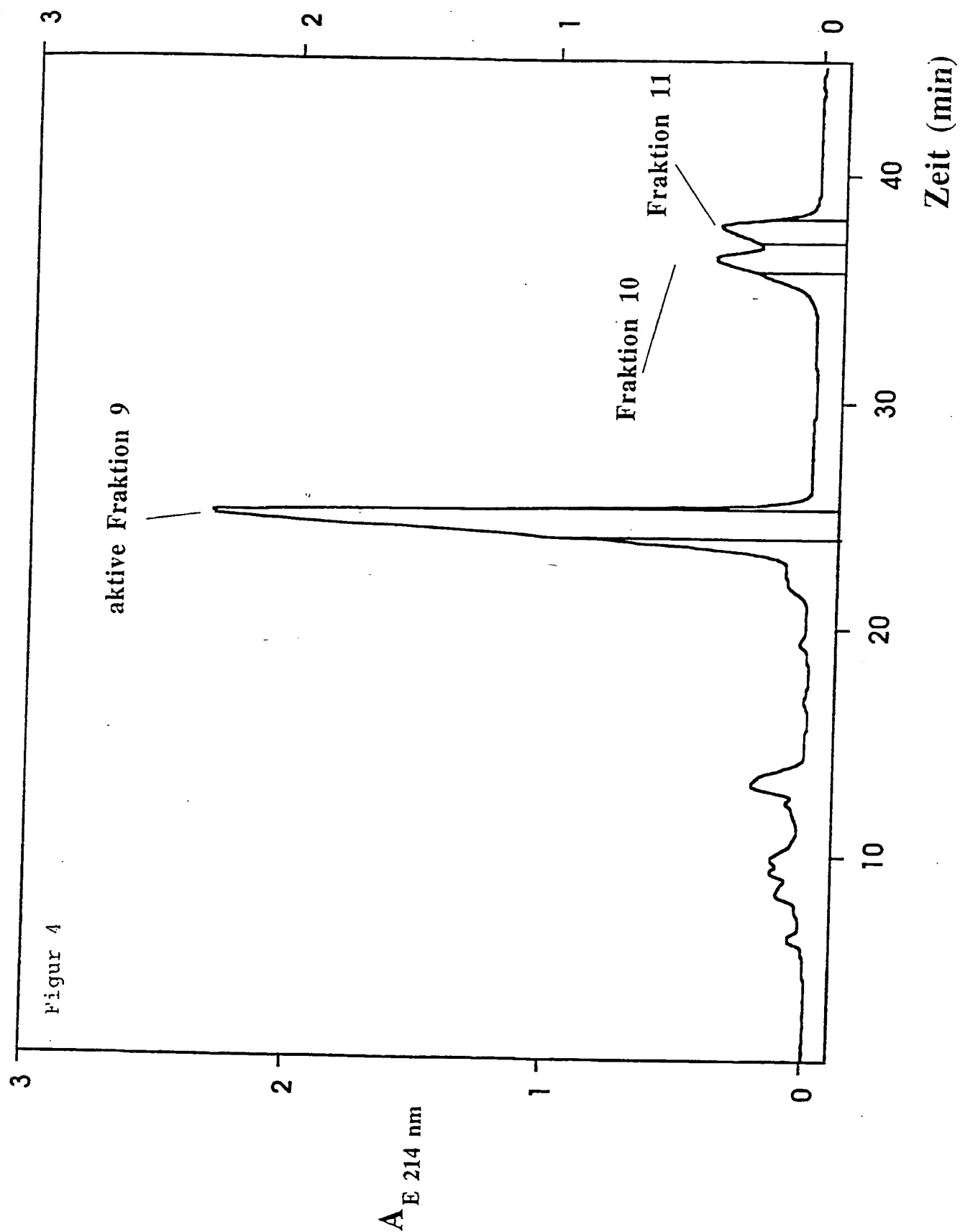
THIS PAGE BLANK (USP10)



THIS PAGE BLANK (uspto)



THIS PAGE BLANK (USPTO)



13 PAGE BLANK (USP10)

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Wolf-Georg Forssmann
- (B) STRASSE: Feodor-Lynen-Strasse 31
- (C) ORT: Hannover
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 30625

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Bifidogene Peptide

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 24

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Glu Gln Leu Leu Arg Leu Lys Lys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Tyr Leu Glu Gln Leu Leu Arg Leu Lys Lys Tyr
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Asn Arg Gln Arg Asn Ile Leu Arg
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 13 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Tyr Met Asn Gly Met Asn Arg Gln Arg Asn Ile Leu Arg
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

His Thr Gly Leu Arg Arg Thr Ala
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Phe Thr Ala Ile Gln Asn Leu Arg Lys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Glu Val Ala Ala Arg Ala Arg Val Val Trp
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Leu Ala Arg Thr Leu Lys Arg Leu Lys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Tyr Lys Gln Lys Val Glu Lys Val
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Ala Arg Arg Ala Arg Val Val Trp Cys Ala Val Gly
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

Cys Ile Ala Leu
1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 13 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Ala Arg Arg Ala Arg Val Val Trp Cys Ala Val Gly Glu
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 55 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

Tyr Gln Arg Arg Pro Ala Ile Ala Ile Asn Asn Pro Tyr Val Pro Arg
1 5 10 15

Thr Tyr Tyr Ala Asn Pro Ala Val Val Arg Pro His Ala Gln Ile Pro
20 25 30

Gln Arg Gln Tyr Leu Pro Asn Ser His Pro Pro Thr Val Val Arg Arg
35 40 45

Pro Asn Leu His Pro Ser Phe
50 55

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 49 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Thr Val Ser Gln Pro Glu
1 5 10 15

Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Arg Val Arg Gly
20 25 30

THIS PAGE BLANK (USPIU)

6

Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro' Ile Gln Cys Ile Gln
 35 40 45
 Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 48 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: nicht bekannt
 (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

Gly Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala Val Ser Gln Pro Glu Ala
 1 5 10 15
 Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro
 20 25 30
 Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro Ile Gln Cys Ile Gln Ala
 35 40 45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 49 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: nicht bekannt
 (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala Val Ser Gln Pro Glu
 1 5 10 15
 Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly
 20 25 30
 Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro Ile Gln Cys Ile Gln
 35 40 45
 Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 26 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: nicht bekannt
 (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

Val Tyr Gln His Gln Lys Ala Met Pro Lys Pro Trp Ile Gln Pro Lys
1 5 10 15
Thr Lys Val Ile Pro Tyr Val Arg Tyr Leu
20 25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

Ala Arg Arg Ala Arg Val Val Trp Ala Ala Val Gly
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

Cys Ala Val Gly Gly Gly Cys Ile Ala Leu
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

Arg His Thr Arg Lys Tyr Trp Cys Arg Gln Gly Ala Arg Gly Gly Cys
1 5 10 15
Ile Thr Leu

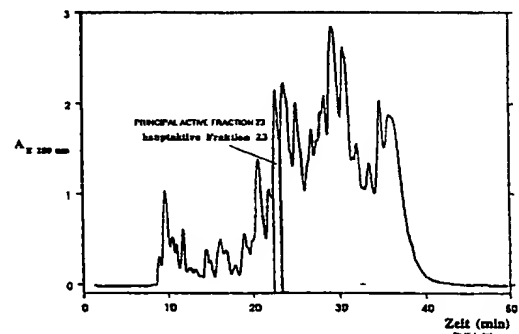
THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 14/79, 14/47, 14/765, 14/705, C12N 9/36, A23L 1/305, C07K 5/103, 7/06, 16/04, C12N 15/12, G01N 33/68, A61K 38/07, 38/08, 38/17, 38/40, 38/38, 38/47		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/14231
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	25. März 1999 (25.03.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/05899		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 16. September 1998 (16.09.98)		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	
(30) Prioritätsdaten: 197 40 604.1 16. September 1997 (16.09.97) DE 198 05 385.1 11. Februar 1998 (11.02.98) DE			
(71)(72) Anmelder und Erfinder: FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 8. Juli 1999 (08.07.99)	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ZUCHT, Hans-Dieter [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). LIEPKE, Cornelia [DE/DE]; Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE).			
(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).			

(54) Title: BIFIDUS STIMULATING PEPTIDES AND ITS USES**(54) Bezeichnung:** BIFIDOGENE PEPTIDE UND DEREN VERWENDUNG**(57) Abstract**

The invention relates to peptides which are obtainable by mixing cow milk or human milk with proteases followed by a two hour incubation; centrifugation in order to remove milk fat; acidification to a pH of 2.0 by strong acidulation; separating the precipitated proteins; applying at least one reverse phase high pressure liquid chromatography (HPLC) step; applying a cationic exchanger HPLC step; collecting fractions; adjusting the fractions to a salt content < 25 mM for executing an activity test by means of dialysis or reverse phase HPLC; cultivating bifidobacterium and e coli in the presence of the fractions and selection of fractions which satisfy condition $BW/B_0 - EW/E_0 \geq 0,15$, wherein BW denotes the bacterial count which is obtained during a 16-hour incubation of bifidobacterium in 50 % elliker broth in the presence of peptides in a concentration of 200 µg/ml, B₀ denotes the bacterial count which is obtained during the agent-free control incubation, EW denotes the bacterial count which is obtained during 16 hour incubation of e coli in 3 g/l tryptic soy broth in the presence of the peptides in a concentration of 200 µg/ml, E₀ denotes the bacterial count which is obtained during the agent-free control incubation; and isolating the available peptide in said fraction. In addition, the amidated, acetylated, sulphatized, phosphorylated, glycosylized, oxidized derivatives or fragments with bifidus stimulating characteristics and peptides are obtainable by combining the peptides, fragments or derivatives by means of chemical bonding.



(57) Zusammenfassung

Peptide erhältlich durch Versetzen von Kuhmilch oder Humanmilch mit Proteasen und anschließender Inkubation für zwei Stunden, Zentrifugation, um Milchfett zu entfernen, Ansäuern auf einen pH von 2,0 durch starke Säuren, Abtrennung der ausgefallenen Proteine, Anwendung mindestens eines Reverse-Phase-HPLC-Schrittes, Anwendung eines Kationenaustauscher-HPLC-Schrittes, Sammeln von Fraktionen, Einstellen der Fraktion auf einen Salzgehalt < 25 mM für die Durchführung von Aktivitätstests durch Dialyse oder Reverse-Phase-HPLC, Kultivierung von Bifidobakterium Bifidum und E. coli in Gegenwart der Fraktionen und Auswahl von Fraktionen, die der Bedingung: $BW/B0 - EW/E0 \geq 0,15$ (bifidogen) genügen, worin BW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von Bifidobakterium Bifidum in 50 % Elliker Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/ml erhalten wird, B0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird, EW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von E. coli in 3 g/l Tryptic Soy Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/l erhalten wird, E0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird, Isolierung des in dieser Fraktion vorhandenen Peptids sowie die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylierten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Fragmente mit bifidogenen Eigenschaften und Peptide, die durch Kombination der Peptide, Fragmente oder Derivate mittels chemischer Verknüpfung erhältlich sind.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/05899

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K14/79 C07K14/47 C07K14/765 C07K14/705 C12N9/36
 A23L1/305 C07K5/103 C07K7/06 C07K16/04 C12N15/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim N .
X	AMETANI E.A.: "ANTIBODY RESPONSE OF THREE DIFFERENT STRAINS OF MICE TO ALPHA-S1-CASEIN ANALYZED BY USING PROTEOLYTIC AND SYNTHETIC PEPTIDES" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol. 154, No. 3, 15 August 1988, ORLANDO, FL US, Pages 876-882, XP002094248 See Table 1 and Fig. 1	1-3,8
X	SPUERGIN, P. ET AL: "Allergenic epitopes of bovine.alpha.s1-casein recognized by human IgE an IgG" ALLERGY (COPENHAGEN) (1996), 51(5), 306-312 CODEN: LLRGDY;ISSN: 0105-4538, 1996, XP002094249 See the whole document	1-3,5,8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 February 1999 (22.02.99)

Date of mailing of the international search report

24 May 1999 (24.05.99)

Name and mailing address of the ISA/

European patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application N .

PCT/EP 98/05899

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/68 A61K38/07 A61K38/08 A61K38/17 A61K38/40
A61K38/38 A61K38/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9439 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 94-313708 XP002094254 & JP 06 239 888 A (KANEBO LTD) , 30.August 1994 See abstract</p>	1-3,7,10
X	<p>KIZAWA: "Calmodulin binding peptide comprising alpha-casein exorphin" J.AGRIC.FOOD.CHEM., Vol 45, No. 5, May 1997 Pages 1579-1581, XP002094250 See the whole document</p>	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 February 1999 (22.02.99)

Date of mailing of the international search report

24 May 1999 (24.05.99)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone N .

International application No.
PCT/EP 98/05899

PCT/EP 98/05899

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant t claim No.
A	<p>BELLAMY E.A.: "Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin" J.APPLIED BACTERIOLOGY, Vol. 73, No. 6, 1992, Pages 472-479, XP002094251 See the whole document</p>	1-10
A	<p>ETIENNE E.A.: "Growth promotion of Bifidobacterium animalis by bovine milk proteose-peptone" LAIT, Vol. 74, 1994, Pages 313-323, XP002094252 See the whole document</p>	1-10
A	<p>PROULX E.A.: "Comparison of bifidobacterial growth-promoting activity of ultrafiltered casein hydrolyzate reactions" LAIT, Vol. 74, 1994, Pages 139-152, XP002094253 See the whole document</p>	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP98/05899

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

See ADDITIONAL MATTER
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See ADDITIONAL MATTER

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-10 (in part)

Remark on Protest

☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

Claims Nos.: 1, 3-10 (in part)

Claim 1 of the application relates to peptides which are only defined as being obtainable by proteolysis of cow milk or human milk, by cleavage of peptide fractions and by selecting these fractions according to the property of being able to provide bifidus bacteria with a growth advantage.

There is no structural definition for each of these peptides.

For this reason a useful search could only include, apart from to the method of production, the peptides actually disclosed in the application. The search was therefore also limited to the peptides cited in Claim 2 and includes Claim 2 and Claims 3-10 in so far as they relate to Claim 2 (Article 17 (2) (a) (ii) PCT).

The International Searching Authority has found that this international application contains multiple inventions, as follows:

1. Claims Nos. 1- 10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 1 or 2, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

2. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 3 or 4, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

3. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 5,9,18,19 or 20, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

4. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 6, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

5. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 7, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

6. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 8,14,16 or 22, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

7. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 10, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

8. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 11, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

9. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 12, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

10. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 13, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

11. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 15, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

12. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 17, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

13. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 21, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

14. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 24, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC 1 / EP 98/05899

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07K14/79 C07K14/47 C07K14/765 C07K14/705 C12N9/36
A23L1/305 C07K5/103 C07K7/06 C07K16/04 C12N15/12
G01N33/68 A61K38/07 A61K38/08 A61K38/17 A61K38/40

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K C12N A23L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	AMETANI E.A.: "ANTIBODY RESPONSE OF THREE DIFFERENT STRAINS OF MICE TO ALPHA-S1-CASEIN ANALYZED BY USING PROTEOLYTIC AND SYNTHETIC PEPTIDES" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Bd. 154, Nr. 3, 15. August 1988, ORLANDO, FL US, Seiten 876-882, XP002094248 See Table 1 and Fig.1	1-3,8
X	SPUERGIN, P. ET AL: "Allergenic epitopes of bovine.alpha.s1-casein recognized by human IgE an IgG" ALLERGY (COPENHAGEN) (1996), 51(5), 306-312 CODEN: LLRGDY;ISSN: 0105-4538, 1996, XP002094249 siehe das ganze Dokument	1-3,5,8

-/-

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Februar 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24.05.1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

GROENENDIJK, M

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K38/38 A61K38/47

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9439 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 94-313708 XP002094254 & JP 06 239 888 A (KANEBO LTD) , 30.August 1994 siehe Zusammenfassung ---	1-3,7,10
X	KIZAWA: "Calmodulin binding peptide comprising alpha-casein exorphin" J.AGRIC.FOOD.CHEM., Bd. 45, Nr. 5, Mai 1997, Seiten 1579-1581, XP002094250 siehe das ganze Dokument --- -/--	1-3



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Februar 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

GROENENDIJK, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BELLAMY E.A.: "Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin" J.APPLIED BACTERIOLOGY, Bd. 73, Nr. 6, 1992, Seiten 472-479, XP002094251 siehe das ganze Dokument ---	1-10
A	ETIENNE E.A.: "Growth promotion of Bifidobacterium animalis by bovine milk proteose-peptone" LAIT, Bd. 74, 1994, Seiten 313-323, XP002094252 siehe das ganze Dokument ---	1-10
A	PROULX E.A.: "Comparison of bifidobacterial growth-promoting activity of ultrafiltered casein hydrolyzate reactions" LAIT, Bd. 74, 1994, Seiten 139-152, XP002094253 siehe das ganze Dokument -----	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

.nationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/ 05899

F Id I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

Siehe WEITERE ANGABEN

2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

Siehe WEITERE ANGABEN

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

1-10 (partiell)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Ansprüche Nr.: 1,3-10 (teilweise)

Der Anspruch 1 der Anmeldung bezieht sich auf Peptide, welche nur dadurch definiert sind, dass sie erhältlich sind durch Proteolyse von Kuh- oder Humanmilch, Abspaltung von Peptidfraktionen und selektieren dieser Fraktionen auf die Eigenschaft, Bifidobakterien einen Wachstumvorteil zu verschaffen.

Es fehlt jede strukturelle Definition dieser Peptide.

Deswegen könnte eine zweckmässige Recherche neben dem Herstellungs-verfahren nur die tatsächlich in der Anmeldung offenbarten Peptide umfassen. Die Recherche hat sich denn auch beschränkt auf die in den Anspruch 2 genannten Peptide und umfasst Anspruch 2 und die Ansprüche 3-10 sofern sie sich auf Anspruch 2 beziehen (Art. 17(2)(a)(ii)PCT).

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 1 oder 2, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

2. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 3 oder 4, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

3. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 5,9,18,19 oder 20, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

4. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 6, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

5. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 7, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

6. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 8,14,16 oder 22, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

und deren Verwendung

7. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 10, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

8. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 11, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

9. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 12, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

10. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 13, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

11. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 15 oder 23, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

12. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 17, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

13. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 21,
deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide,
Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und
Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper
und deren Verwendung

14. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 24,
deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide,
Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und
Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper
und deren Verwendung

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 s. wie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 981448wo Me/gn	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 98/05899	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 16/09/1998	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 16/09/1997
Anmelder FORSSMANN, Wolf-Georg et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 9 Blätter.

☐ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☒ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

BIFIDOGENE PEPTIDE UND DEREN VERWENDUNG

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____
- ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen
- ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
- ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.
- ☒ keine der Abb.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

F Id I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht rech rchi rbar erwisen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

Siehe WEITERE ANGABEN
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

F Id II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

Siehe WEITERE ANGABEN

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

1-10 (partiell)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Ansprüche Nr.: 1,3-10 (teilweise)

Der Anspruch 1 der Anmeldung bezieht sich auf Peptide, welche nur dadurch definiert sind, dass sie erhältlich sind durch Proteolyse von Kuh- oder Humanmilch, Abspaltung von Peptidfraktionen und selektieren dieser Fraktionen auf die Eigenschaft, Bifidobakterien einen Wachstumvorteil zu verschaffen.

Es fehlt jede strukturelle Definition dieser Peptide.

Deswegen könnte eine zweckmässige Recherche neben dem Herstellungs-verfahren nur die tatsächlich in der Anmeldung offenbarten Peptide umfassen. Die Recherche hat sich denn auch beschränkt auf die in den Anspruch 2 genannten Peptide und umfasst Anspruch 2 und die Ansprüche 3-10 sofern sie sich auf Anspruch 2 beziehen (Art. 17(2)(a)(ii)PCT).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 1 oder 2, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

2. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 3 oder 4, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

3. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 5,9,18,19 oder 20, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

4. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 6, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

5. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 7, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

6. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 8,14,16 oder 22, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper

THIS PAGE BLANK (USPTO)

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

und deren Verwendung

7. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 10, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

8. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 11, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

9. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 12, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

10. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 13, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

11. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 15 oder 23, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

12. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 17, deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide, Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper und deren Verwendung

THIS PAGE BLANK (USPTO)

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

13. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 21,
deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide,
Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und
Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper
und deren Verwendung

14. Ansprüche: 1-10(partiell)

Peptide definiert in Anspruch 2 enthaltend SEQ ID NO 24,
deren Herstellung, DNA kodierend für diese Peptide,
Antikörper gegen diese Peptide, Arznei-, Nahrungs- und
Diagnostikmitteln auf Basis dieser Peptide oder Antikörper
und deren Verwendung

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6	C07K14/79	C07K14/47	C07K14/765	C07K14/705	C12N9/36
	A23L1/305	C07K5/103	C07K7/06	C07K16/04	C12N15/12
	G01N33/68	A61K38/07	A61K38/08	A61K38/17	A61K38/40

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K C12N A23L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	AMETANI E.A.: "ANTIBODY RESPONSE OF THREE DIFFERENT STRAINS OF MICE TO ALPHA-S1-CASEIN ANALYZED BY USING PROTEOLYTIC AND SYNTHETIC PEPTIDES" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Bd. 154, Nr. 3, 15. August 1988, ORLANDO, FL US, Seiten 876-882, XP002094248 See Table 1 and Fig.1	1-3,8
X	SPUERGIN, P. ET AL: "Allergenic epitopes of bovine.alpha.s1-casein recognized by human IgE an IgG" ALLERGY (COPENHAGEN) (1996), 51(5), 306-312 CODEN: LLRGDY; ISSN: 0105-4538, 1996, XP002094249 siehe das ganze Dokument	1-3,5,8

-/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Februar 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24.05.1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

GROENENDIJK, M

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K38/38 A61K38/47

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9439 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 94-313708 XP002094254 & JP 06 239 888 A (KANEBO LTD) , 30.August 1994 siehe Zusammenfassung	1-3,7,10
X	KIZAWA: "Calmodulin binding peptide comprising alpha-casein exorphin" J.AGRIC.FOOD.CHEM., Bd. 45, Nr. 5, Mai 1997, Seiten 1579-1581, XP002094250 siehe das ganze Dokument --- -/--	1-3

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Februar 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

GROENENDIJK, M

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>BELLAMY E.A.: "Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin"</p> <p>J.APPLIED BACTERIOLOGY, Bd. 73, Nr. 6, 1992, Seiten 472-479, XP002094251 siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-10
A	<p>ETIENNE E.A.: "Growth promotion of Bifidobacterium animalis by bovine milk proteose-peptone"</p> <p>LAIT, Bd. 74, 1994, Seiten 313-323, XP002094252 siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-10
A	<p>PROULX E.A.: "Comparison of bifidobacterial growth-promoting activity of ultrafiltered casein hydrolyzate reactions"</p> <p>LAIT, Bd. 74, 1994, Seiten 139-152, XP002094253 siehe das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

REC'D 28 DEC 1999

PCT

WIPO PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT).



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 981448wo Me/kk	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/05899	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 16/09/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 16/09/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K38/38		
Anmelder FORSSMANN, Wolf-Georg et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 04/12/1998	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 22.12.99
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Deck, A Tel. Nr. +49 89 2399 8432 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/05899

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-16 ~~ursprüngliche Fassung~~

Patentansprüche, Nr.:

1-4 eingegangen am 04/11/1999 mit Schreiben vom 02/11/1999

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Anspruch Nr. 4.

Begründung:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/05899

- ☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☒ Für die obengenannten Ansprüche Nr. 4 wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-3
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1-3
	Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-3
	Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zu Punkt V

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: AMETANI ET A.: 'Antibody response of three different strains of mice to alpha-s1-casein analyzed by using proteolytic and synthetic peptides'

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Bd. 154, Nr. 3, 15. August 1988, ORLANDO, FL US, Seiten 876-882, XP002094248

D2: SPUERGIN ET AL.: 'Allergenic epitopes of bovine.alpha.s1-casein recognized by human IgE an IgG' ALLERGY (COPENHAGEN) (1996), 51(5), 306-312 CODEN: LLRGDY; ISSN: 0105-4538, 1996, XP002094249

D3: KIZAWA: 'Calmodulin binding peptide comprising alpha-casein exorphin' J.AGRIC.FOOD.CHEM., Bd. 45, Nr. 5, Mai 1997, Seiten 1579-1581, XP002094250

Die vorliegende Anmeldung erfüllt die Erfordernisse des Artikels 33(2) und (3) PCT, weil der Gegenstand der Ansprüche 1 bis 3 neu ist.

Die Dokumente D1, D2 und D3 beschreiben Peptide der Aminosäuresequenz R₁-EQLRLKK-R₂ oder R₁-YLEQLRLKKY-R₂ aber nicht deren Verwendung zur

Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von durch mikrobielle Fehlbesiedlungen bedingten Erkrankungen.

Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Auf der Seite 4, Zeile 2 der Beschreibung, scheint ein Fehler vorzuliegen, anstelle von "Bakterien" sollte es wohl "Peptide" heißen.

THIS PAGE BLANK (uspto)

Ansprüche

1. Verwendung von Peptiden, die erhältlich sind durch

- Versetzen von Kuhmilch oder Humanmilch mit Proteasen und anschließender Inkubation für zwei Stunden,
- Zentrifugation, um Milchfett zu entfernen,
- Ansäuern auf einen pH von 2,0 durch starke Säuren,
- Abtrennung der ausgefallenen Proteine,
- Anwendung mindestens eines Reverse-Phase-HPLC-Schrittes,
- Anwendung eines Kationenaustauscher-HPLC-Schrittes,
- Sammeln von Fraktionen,
- Einstellen der Fraktion auf einen Salzgehalt < 25 mM für die Durchführung von Aktivitätstests durch Dialyse oder Reverse-Phase-HPLC,
- Kultivierung von Bifidobakterium Bifidum und E. coli in Gegenwart der Fraktionen und Auswahl von Fraktionen, die der Bedingung

$$\begin{array}{ccccc} \text{BW} & & \text{EW} & & \\ -- & - & -- & \geq 0,15 & (\text{bifidogen}) \\ \text{B0} & & \text{E0} & & \end{array}$$

genügen, worin BW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von Bifidobakterium Bifidum in 50% Elliker Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ erhalten wird,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

B0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird,

EW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von E. coli in 3 g/l Tryptic Soy Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 ig/l erhalten wird,

~~E0 die Keimzahl~~ bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird,

- Isolierung des in dieser Fraktion vorhandenen Peptids

sowie die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylierten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Fragmente mit bifidogenen Eigenschaften und Peptide, die durch Kombination der Peptide, Fragmente oder Derivate mittels chemischer Verknüpfung erhältlich sind, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von durch mikrobielle Fehlbesiedlungen bedingten Erkrankungen beispielsweise durch Bakterien, Pilze, Hefen, Protisten, Viren, Mycoplasmen, Filarien, Plasmodien, wie Infektionen Entzündungen, mikrobiell induzierten Tumoren, mikrobiell bedingten degenerativen Erkrankungen, Durchfallerkrankungen, Koliken, Abweichung der Mund-, Darm- und Vaginalflora, Karies.

2. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei Peptide verwendet werden mit der Aminosäuresequenz

R₁-EQLLRLKK-R₂, R₁-YLEQLLRLKKY-R₂, R₁-NRQRNLR-R₂,

R₁-YMNGMNRQRNLR-R₂, R₁-FQWQRNMRK-R₂, R₁-HTGLRRTA-R₂,

R₁-FTAIQNLRK-R₂, R₁-EVAARARVW-R₂, R₁-WQRNMRKV-R₂,

R₁-LARTLKRLK-R₂, R₁-YKQKVEKV-R₂, R₁-LVRYTKKV-R₂,

R₁-KYLYEIARR-R₂, R₁-ARRARVWCAVG-R₂, R₁-ARRARVWCAVGE-R₂,

R₃-CIAL-R₄

R₃-CIAL-R₄

THIS PAGE BLANK (USPTO)

R₁-YQRRPALAINNPYVPRTYYANPAVVRPHAQIPQRQYLPNSHPPTVVRPNLHPSF-R₂,
R₁-GRRRRSVQWCTVSQPEATKCFQWQRNMRVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA-R₂,
R₁-GRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA-R₂,
R₁-GRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA-R₂,
R₁-VYQHQAAMPKPWIQPKTKVIPYVRYL-R₂, R₁-ARRARVVWAAVG-R₂,
R₁-CAVGGGCIAL-R₂,
R₁-RHTRKYWCRQGARGGCITL-R₂.

worin

R₁, R₃ unabhängig voneinander NH₂, eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis 100 Aminosäuren darstellen und

R₂, R₄ unabhängig voneinander COOH, CONH₂, eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis zu 100 Aminosäuren darstellen und die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylierten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Fragmente mit bifidogenen Eigenschaften.

3. Verwendung von Nukleinsäuren kodierend für die im Anspruch 1 und/oder 2 genannten Peptide zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von durch mikrobielle Fehlbesiedlungen bedingten Erkrankungen beispielsweise durch Bakterien, Pilze, Hefen, Protisten, Viren, Mycoplasmen, Filarien, Plasmodien, wie Infektionen Entzündungen, mikrobiell induzierten Tumoren, mikrobiell bedingten degenerativen Erkrankungen, Durchfallerkrankungen, Koliken, Abweichung der Mund-, Darm- und Vaginalflora, Karies.
4. Peptide mit den Seq. ID Nr. 10, 22 und 23 zur Verwendung gemäß Anspruch 1.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/05899

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K14/79 C07K14/47 C07K14/765 C07K14/705 C12N9/36
A23L1/305 C07K5/103 C07K7/06 C07K16/04 C12N15/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N A23L

PCT Rec'd 16 MAR 2000

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AMETANI E.A.: "ANTIBODY RESPONSE OF THREE DIFFERENT STRAINS OF MICE TO ALPHA-S1-CASEIN ANALYZED BY USING PROTEOLYTIC AND SYNTHETIC PEPTIDES" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol. 154, No. 3, 15 August 1988, ORLANDO, FL US, Pages 876-882, XP002094248 See Table 1 and Fig. 1	1-3,8
X	SPUERGIN, P. ET AL: "Allergenic epitopes of bovine.alpha.s1-casein recognized by human IgE an IgG" ALLERGY (COPENHAGEN) (1996), 51(5), 306-312 CODEN: LLRGDY; ISSN: 0105-4538, 1996, XP002094249 See the whole document	1-3,5,8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 February 1999 (22.02.99)

Date of mailing of the international search report

24 May 1999 (24.05.99)

Name and mailing address of the ISA/

European patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/05899

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/68 A61K38/07 A61K38/08 A61K38/17 A61K38/40
A61K38/38 A61K38/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9439 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 94-313708 XP002094254 & JP 06 239 888 A (KANEBO LTD) , 30.August 1994 See abstract</p>	1-3,7,10
X	<p>KIZAWA: "Calmodulin binding peptide comprising alpha-casein exorphin" J.AGRIC.FOOD.CHEM., Vol 45, No. 5, May 1997 Pages 1579-1581, XP002094250 See the whole document</p>	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 February 1999 (22.02.99)

Date of mailing of the international search report

24 May 1999 (24.05.99)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 98/05899

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BELLAMY E.A.: "Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin" J.APPLIED BACTERIOLOGY, Vol. 73, No. 6, 1992, Pages 472-479, XP002094251 See the whole document</p>	1-10
A	<p>ETIENNE E.A.: "Growth promotion of Bifidobacterium animalis by bovine milk proteose-peptone" LAIT, Vol. 74, 1994, Pages 313-323, XP002094252 See the whole document</p>	1-10
A	<p>PROULX E.A.: "Comparison of bifidobacterial growth-promoting activity of ultrafiltered casein hydrolyzate reactions" LAIT, Vol. 74, 1994, Pages 139-152, XP002094253 See the whole document</p>	1-10

THIS PAGE BLANK (uspto)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP98/05899

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

See ADDITIONAL MATTER
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See ADDITIONAL MATTER

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-10 (in part)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

THIS PAGE BLANK (over)

Claims Nos.: 1, 3-10 (in part)

Claim 1 of the application relates to peptides which are only defined as being obtainable by proteolysis of cow milk or human milk, by cleavage of peptide fractions and by selecting these fractions according to the property of being able to provide bifidus bacteria with a growth advantage.

There is no structural definition for each of these peptides.

For this reason a useful search could only include, apart from to the method of production, the peptides actually disclosed in the application. The search was therefore also limited to the peptides cited in Claim 2 and includes Claim 2 and Claims 3-10 in so far as they relate to Claim 2 (Article 17 (2) (a) (ii) PCT).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The International Searching Authority has found that this international application contains multiple inventions, as follows:

1. Claims Nos. 1- 10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 1 or 2, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

2. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 3 or 4, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

3. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 5,9,18,19 or 20, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

4. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 6, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

5. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 7, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

6. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 8,14,16 or 22, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

7. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 10, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

8. Claims Nos. 1-10 (in part)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 11, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

9. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 12, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

10. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 13, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

11. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 15, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

12. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 17, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

13. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 21, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

14. Claims Nos. 1-10 (in part)

Peptides defined in Claim 2 containing SEQ ID NO 24, the production thereof, DNA coding for these peptides, antibodies against these peptides, medicaments, foodstuffs and means of diagnosis based on these peptides or antibodies and the use thereof

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PTO/PCT Rec'd 16 MAR 2000

To:

(PCT Rule 24.2(a))

OK 10.12.98

MEYERS, Hans-Wilhelm
Postfach 10 22 41
D-50462 Köln
ALLEMAGNE

07. DEZ. 1998

Date of mailing (day/month/year) 24 November 1998 (24.11.98)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 981448wo Me/gn	International application No. PCT/EP98/05899

EP :AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE
National :JP,US

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:</p> <p>Margret Fourné-Godbersen</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
--	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is **the applicant's responsibility** to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MEYERS, Hans-Wilhelm
Postfach 10 22 41
D-50462 Köln
ALLEMAGNE

W	Sg	W	Da	Hi	HPJ	ME	TW	JH	K
30. DEZ. 1998									
F 16.5.99 / 1.2.1									

Date of mailing (day/month/year) 15 December 1998 (15.12.98)	
Applicant's or agent's file reference 981448wo Me/gn	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP98/05899	International filing date (day/month/year) 16 September 1998 (16.09.98)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 16 September 1997 (16.09.97)
Applicant FORSSMANN, Wolf-Georg et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
16 Sept 1997 (16.09.97)	197 40 604.1	DE	20 Nove 1998 (20.11.98)
11 Febr 1998 (11.02.98)	198 05 385.1	DE	10 Dece 1998 (10.12.98)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

S. Baharlou

Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MEYERS, Hans-Wilhelm
Postfach 10 22 41
D-50462 Köln
ALLEMAGNE

Awk	Sg	W	Da	Hi	HPJ	ME	TW	JH	k
C 6. APR. 1999									
F: 16.03.00 / 16.01.00									

Date of mailing (day/month/year) 25 March 1999 (25.03.99)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference 981448wo Me/gn			
International application No. PCT/EP98/05899	International filing date (day/month/year) 16 September 1998 (16.09.98)	Priority date (day/month/year) 16 September 1997 (16.09.97)	
Applicant FORSSMANN, Wolf-Georg et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
EP,JP,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
None

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
25 March 1999 (25.03.99) under No. WO 99/14231

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PTO/PCT Rec'd 10 MAR 2000

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 981448wo Me/kk	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/05899	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 16/09/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 16/09/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K38/38		
Anmelder FORSSMANN, Wolf-Georg et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts:
 - ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 04/12/1998	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 22.12.99
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Deck, A Tel. Nr. +49 89 2399 8432 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/05899

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-16 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-4 eingegangen am 04/11/1999 mit Schreiben vom 02/11/1999

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 4.

Begründung:

THIS PAGE BLANK (USP10)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/05899

- ☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☒ Für die obengenannten Ansprüche Nr. 4 wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-3
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1-3
	Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-3
	Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zu Punkt V

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: AMETANI ET AL.: 'Antibody response of three different strains of mice to alpha-s1-casein analyzed by using proteolytic and synthetic peptides'

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Bd. 154, Nr. 3, 15. August 1988, ORLANDO, FL US, Seiten 876-882, XP002094248

D2: SPUERGIN ET AL.: 'Allergenic epitopes of bovine.alpha.s1-casein recognized by human IgE and IgG' ALLERGY (COPENHAGEN) (1996), 51(5), 306-312 CODEN: LLRGDY; ISSN: 0105-4538, 1996, XP002094249

D3: KIZAWA: 'Calmodulin binding peptide comprising alpha-casein exorphin' J.AGRIC.FOOD.CHEM., Bd. 45, Nr. 5, Mai 1997, Seiten 1579-1581, XP002094250

Die vorliegende Anmeldung erfüllt die Erfordernisse des Artikels 33(2) und (3) PCT, weil der Gegenstand der Ansprüche 1 bis 3 neu ist.

Die Dokumente D1, D2 und D3 beschreiben Peptide der Aminosäuresequenz R₁-EQLLRLKK-R₂ oder R₁-YLEQLLRLKKY-R₂ aber nicht deren Verwendung zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von durch mikrobielle Fehlbesiedlungen bedingten Erkrankungen.

Zu Punkt VII

Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Auf der Seite 4, Zeile 2 der Beschreibung, scheint ein Fehler vorzuliegen, anstelle von "Bakterien" sollte es wohl "Peptide" heißen.

THIS PAGE BLANK (uspto)

A n s p r ü c h e

1. Verwendung von Peptiden, die erhältlich sind durch

- Versetzen von Kuhmilch oder Humanmilch mit Proteasen und anschließender Inkubation für zwei Stunden,
- Zentrifugation, um Milchfett zu entfernen,
- Ansäuern auf einen pH von 2,0 durch starke Säuren,
- Abtrennung der ausgefallenen Proteine,
- Anwendung mindestens eines Reverse-Phase-HPLC-Schrittes,
- Anwendung eines Kationenaustauscher-HPLC-Schrittes,
- Sammeln von Fraktionen,
- Einstellen der Fraktion auf einen Salzgehalt $< 25 \text{ mM}$ für die Durchführung von Aktivitätstests durch Dialyse oder Reverse-Phase-HPLC,
- Kultivierung von Bifidobakterium Bifidum und E. coli in Gegenwart der Fraktionen und Auswahl von Fraktionen, die der Bedingung

$$\begin{array}{ccccc} \text{BW} & & \text{EW} & & \\ -- & - & -- & \geq 0,15 & (\text{bifidogen}) \\ \text{B0} & & \text{E0} & & \end{array}$$

genügen, worin BW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von Bifidobakterium Bifidum in 50% Elliker Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 ig/ml erhalten wird,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

B0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird,

EW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von E. coli in 3 g/l Tryptic Soy Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/l erhalten wird,

E0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird,

- Isolierung des in dieser Fraktion vorhandenen Peptids

sowie die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylierten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Fragmente mit bifidogenen Eigenschaften und Peptide, die durch Kombination der Peptide, Fragmente oder Derivate mittels chemischer Verknüpfung erhältlich sind, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von durch mikrobielle Fehlbesiedlungen bedingten Erkrankungen beispielsweise durch Bakterien, Pilze, Hefen, Protisten, Viren, Mycoplasmen, Filarien, Plasmodien, wie Infektionen Entzündungen, mikrobiell induzierten Tumoren, mikrobiell bedingten degenerativen Erkrankungen, Durchfallerkrankungen, Koliken, Abweichung der Mund-, Darm- und Vaginalflora, Karies.

2. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei Peptide verwendet werden mit der Aminosäuresequenz

R₁-EQLLRLKK-R₂, R₁-YLEQLLRLKKY-R₂, R₁-NRQRNILR-R₂,

R₁-YMNGMNRQRNILR-R₂, R₁-FQWQRNMRK-R₂, R₁-HTGLRRTA-R₂,

R₁-FTAIQNLRK-R₂, R₁-EVAARARVVW-R₂, R₁-WQRNMRKV-R₂,

R₁-LARTLKRLK-R₂, R₁-YKQKVEKV-R₂, R₁-LVRYTKKV-R₂,

R₁-KYLYEIARR-R₂, R₁-ARRARVVWCAVG-R₂, R₁-ARRARVVWCAVGE-R₂,

R₃-CIAL-R₄

R₃-CIAL-R₄

THIS PAGE BLANK (USPTO)

R₁-YQRRPAIAINNPYVPRTYYANPAVVRPHAQIPQRQYLPNSHPPTVVRRPNLHPSF-R₂,
R₁-GRRRRSVQWCTVSQPEATKCFQWQRNMRRVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA-R₂,
R₁-GRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA-R₂,
R₁-GRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA-R₂,
R₁-VYQHQAAMPKPWIQPKTKVIPYVRYL-R₂, R₁-ARRARVVWAAVG-R₂,
R₁-CAVGGGCIAL-R₂,
R₁-RHTRKYWCRQGARGGCITL-R₂.

worin

R₁, R₃ unabhängig voneinander NH₂, eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis 100 Aminosäuren darstellen und

R₂, R₄ unabhängig voneinander COOH, CONH₂, eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis zu 100 Aminosäuren darstellen und die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylierten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Fragmente mit bifidogenen Eigenschaften.

3. Verwendung von Nukleinsäuren kodierend für die im Anspruch 1 und/oder 2 genannten Peptide zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von durch mikrobielle Fehlbesiedlungen bedingten Erkrankungen beispielsweise durch Bakterien, Pilze, Hefen, Protisten, Viren, Mycoplasmen, Filarien, Plasmodien, wie Infektionen Entzündungen, mikrobiell induzierten Tumoren, mikrobiell bedingten degenerativen Erkrankungen, Durchfallerkrankungen, Koliken, Abweichung der Mund-, Darm- und Vaginalflora, Karies.
4. Peptide mit den Seq. ID Nr. 10, 22 und 23 zur Verwendung gemäß Anspruch 1.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

CLAIMS:

1. Peptides obtainable by

- adding proteases to cow's milk or human milk, followed by incubation for two hours;
- centrifugation to remove milk fat;
- acidification to a pH of 2.0 with strong acids;
- removing the precipitated proteins;
- application of at least one reverse phase HPLC step;
- application of a cation-exchange HPLC step;
- collecting fractions;
- adjusting the fractions to a salt content of < 25 mM by dialysis or reverse phase HPLC for performing activity tests;
- culturing *Bifidobacterium bifidum* and *E. coli* in the presence of the fractions and selecting fractions which meet the requirement:

$$\frac{BW}{B0} - \frac{EW}{E0} \geq 0.15 \text{ (bifidogenic)}$$

THIS PAGE BLANK (USPTO)

wherein BW represents the germ count obtained upon 16 hours of incubation of *Bifidobacterium bifidum* in 50% Elliker broth in the presence of the peptides in a concentration of 200 µg/ml;

B0 represents the germ count obtained in the control incubation without active substances;

EW represents the germ count obtained upon 16 hours of incubation of *E. coli* in 3 g/l tryptic soy broth in the presence of the peptides in a concentration of 200 µg/ml;

E0 represents the germ count obtained in the control incubation without active substances;

- isolation of the peptide contained in this fraction;

and the amidated, acetylated, sulfated, phosphorylated, glycosylated, oxidized derivatives or fragments thereof having bifidogenic properties, and peptides obtainable by the combination of the peptides, fragments or derivatives by chemical bonding.

2. The peptides according to claim 1 having the amino acid sequence:

R₁-EQLLRLKK-R₂, R₁-YLEQLLRLKKY-R₂, R₁-NRQRNILR-R₂,
R₁-YMNGMNRQRNILR-R₂, R₁-FQWQRNMRK-R₂, R₁-HTGLRRTA-R₂,
R₁-FTAIQNLRK-R₂, R₁-EVAARARVW-R₂, R₁-WQRNMRKV-R₂,
R₁-LARTLKRLK-R₂, R₁-YKQKVEKV-R₂, R₁-LVRYTKKV-R₂,
R₁-KYLVEIARR-R₂, R₁-ARRARVVWCAVG-R₂, R₁-ARRARVVWCAVGE-R₂,
R₃-CIAL-R₄ R₃-CIAL-R₄

THIS PAGE BLANK (USPTO)

R_1 -YQRRPAIAINNPYVPRTYYANPAVVRPHAQIPQRQYLPNSHPPTVVRPNLHPSF- R_2 ,
 R_1 -GRRRRSVQWCTVSQPEATKCFQWQRNMRRVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA- R_2 ,
 R_1 -GRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNM RKVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA- R_2 ,
 R_1 -GRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNM RKVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA- R_2 ,
 R_1 -VYQH QKAMPKPWIQPKTKVIPYVRYL- R_2 , R_1 -ARRARVVWAAVG- R_2 ,
 R_1 -CAVGGGCIAL- R_2 ,
 R_1 -RHTRKYWCRQGARGGCITL- R_2 .

wherein

R_1 , R_3 independently represent NH_2 , an amino acid or a peptide containing up to 100 amino acids; and

R_2 , R_4 independently represent $COOH$, $CONH_2$, an amino acid or a peptide containing up to 100 amino acids;

and the amidated, acetylated, sulfated, phosphorylated, glycosylated, oxidized derivatives or fragments thereof having bifidogenic properties.

3. A process for the preparation of the peptides according to claim 1 and/or 2 by isolation and purification from cow's milk or human milk, expression in genetically engineered organisms or chemical synthesis.
4. Nucleic acids coding for peptides according to claim 1 and/or 2.
5. Antibodies directed against peptides according to claim 1 and/or 2.
6. A medicament containing at least one of the peptides according to claim 1 and/or 2 and/or at least one nucleic acid according to claim 3 together with pharmaceutically acceptable excipients.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7. Foodstuff containing peptides according to claim 1 and/or 2 together with nutrients.
8. A diagnostic agent containing peptides according to claim 1 and/or 2 and/or antibodies according to claim 5 together with other auxiliary agents.
9. Use of the peptides according to claim 1 and/or 2 and/or the nucleic acids according to claim 3 for the treatment of diseases caused by misplaced microbial colonizations, for example, by bacteria, fungi, yeasts, protists, viruses, mycoplasmas, filariae, plasmodiums, such as infections, inflammations, microbially induced tumors, microbially caused degenerative diseases, diarrheic diseases, colics, deviations in the oral, intestinal and vaginal floras, caries.
10. Use of the peptides according to claim 1 and/or 2 for the preparation of a foodstuff.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation

16c1

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

0500

3

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 981448wo Me/gn	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP98/05899	International filing date (day/month/year) 16 September 1998 (16.09.98)	Priority date (day/month/year) 16 September 1997 (16.09.97)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 14/79, 14/47, 14/765, 14/705, C12N 9/36, A23L 1/305, C07K 5/103, 7/06, 16/04, C12N 15/12, G01N 33/68, A61K 38/07, 38/08, 38/17, 38/40, 38/38, 38/47		
Applicant FORSSMANN, Wolf-Georg		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.
<input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of <u>3</u> sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:
I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report
II <input type="checkbox"/> Priority
III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited
VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application
VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 04 December 1998 (04.12.98)	Date of completion of this report 22 December 1999 (22.12.1999)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/05899

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-16, as originally filed,

pages _____, filed with the demand,

pages _____, filed with the letter of _____,

pages _____, filed with the letter of _____.

☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,

Nos. _____, as amended under Article 19,

Nos. _____, filed with the demand,

Nos. 1-4, filed with the letter of 02 November 1999 (02.11.1999),

Nos. _____, filed with the letter of _____.

☒ the drawings, sheets/fig 1/4-4/4, as originally filed,

sheets/fig _____, filed with the demand,

sheets/fig _____, filed with the letter of _____,

sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

RECEIVED
JUN 23 2001
TC 1200 MAIL ROOM

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

international application No.

PCT/EP98/05899

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 4

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. _____
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☒ no international search report has been established for said claims Nos. 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-3	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-3	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-3	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The following documents are cited:

D1: AMETANI ET AL.: "Antibody response of three different strains of mice to alpha-s1-casein analyzed by using proteolytic and synthetic peptides", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol. 154, No. 3, 15 August 1988, ORLANDO, FL, US, pages 876-882, XP002094248

D2: SPUERGIN ET AL.: "Allergenic epitopes of bovine alpha.s1-casein recognized by human IgE and IgG", ALLERGY (COPENHAGEN) (1996), 51(5), 306-312, CODEN: LLRGDY; ISSN: 0105-4538, 1996, XP002094249

D3: KIZAWA: "Calmodulin binding peptide comprising alpha-casein exorphin", J.AGRIC.FOOD.CHEM., Vol. 45, No. 5, May 1997, pages 1579-1581, XP002094250.

The present application meets the requirements of PCT Article 33(2) and (3), since the subject matter of Claims 1 to 3 is novel.

D1, D2 and D3 describe peptides of the amino-acid sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

R_1 -EQLLRLKK- R_2 or R_1 -YLEQLLRLKKY- R_2 , but not their use for producing a medicament for treating conditions caused by abnormal microbial colonies.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 98/05899

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Page 4, line 2, of the description appears to contain an error, in that "bacteria" should probably be replaced with "peptides".

THIS PAGE BLANK (USPTO)